

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected	Format Free 
--	---	---------------------	--------------	------------------	--

1. ☐ 1/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

009517760

WPI Acc No: 1993-211301/199326

XRAM Acc No: C93-093649

Reactivation of an immobilised lipase - used in modification of synthesis of ester, involves treating with non-polar and polar solvents

Patent Assignee: NISSHIN OIL MILLS LTD (NISW)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 5137574	A	19930601	JP 91332401	A	19911121	199326 B

Priority Applications (No Type Date): JP 91332401 A 19911121

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 5137574	A	5	C12N-011/00	

Abstract (Basic): JP 5137574 A

Immobilized lipase used in reaction(s) is treated with a nonpolar solvent and a polar solvent in the modification or the synthesis of an ester using the immobilised lipase. The lipase is pref used for transesterification, and the nonpolar solvent and the polar solvent are preferably n-hexane and acetone respectively.

USE/ADVANTAGE - The method can easily reactivate an immobilised lipase on commercial scale.

In an example 300 g of Lipozyme (RTM) (lipase from Mucor niehei immobilised on an anion exchange resin) was filled in a 1 l column and palm oil/rapeseed oil mixt (4:6) was passed through it at 60degC at a rate of 360 g/hr to effect transesterification. Lipozyme thus treated was washed with 5 times amt. of a solvent mixt. of n-hexane and acetone and filled in a column again and transesterified. The transesterification reaction rate restored 92% and the transesterification activity restored 70% of the initial activity

Dwg. 0/1

Title Terms: REACTIVATION; IMMOBILISE; LIPASE; MODIFIED; SYNTHESIS; ESTER;

TREAT; NON; POLE; POLE; SOLVENT

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-011/00

International Patent Class (Additional): C12N-009/20; C12P-007/62

File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected	Format Free 
--	---	---------------------	--------------	------------------	--

© 2003 Dialog, a Thomson business

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-137574

(43)公開日 平成5年(1993)6月1日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 11/00		2121-4B		
// C 1 2 N 9/20		7823-4B		
C 1 2 P 7/62		8114-4B		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平3-332401

(22)出願日 平成3年(1991)11月21日

(71)出願人 000227009

日清製油株式会社

東京都中央区新川1丁目23番1号

(72)発明者 根岸 聡

神奈川県相模原市清新5-4-6

(72)発明者 蓑島 良一

神奈川県横浜市瀬谷区二ツ橋町4767

(54)【発明の名称】 固定化リパーゼの再活性化法

(57)【要約】

【構成】 固定化リパーゼを用いるエステル類の改質または合成において、一度以上反応に使用した固定化リパーゼを非極性溶剤および極性溶剤で処理する。

【効果】 該反応に使用して活性が低下した固定化リパーゼの活性を再活性化でき、長時間にわたって高活性の状態で使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 固定化リパーゼを用いるエステル類の改質または合成において、一度以上反応に使用した固定化リパーゼを非極性溶剤および極性溶剤で処理することを特徴とする固定化リパーゼの再活性化法。

【請求項2】 固定化リパーゼがエステル交換に使用されたものである請求項1に記載の固定化リパーゼの再活性化法。

【請求項3】 非極性溶剤および極性溶剤が、それぞれn-ヘキサンおよびアセトンである請求項1または請求項2に記載の固定化リパーゼ再活性化法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、エステル類の改質および合成において使用する固定化リパーゼの再活性化法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】エステル類の改質および合成反応は、近年、リパーゼの化学作用を活用して研究されており、かくして得られる改質および合成されたエステル類は、食品、化粧品、トイレットリー、医薬、農業、飼料、水産分野をはじめ、インク塗料、樹脂、燃料油、金属加工、電気、電子、機械などの諸分野において利用されている。

【0003】上記のような広範囲の産業分野で利用されるエステル類を、改質あるいは合成するための手法の一つであるリパーゼは、通常、その再利用を主目的として固定化されるが、一般的に固定化リパーゼの活性は、他の酵素と同様、ネイティブなリパーゼそのものに比べて活性が低下する。この原因としては、固定化操作自体により酵素蛋白質のコンホメーションが変化すること、活性中心がブロックされること、反応に際して基質との接触頻度を減少することなどが考えられ、また、反応時における熱変性、活性阻害剤の共存などがあげられている。このため、固定化リパーゼを調整する際の活性化法については、多くの提案がなされている。

【0004】例えば、リパーゼの活性化剤として、レンチン、キトサン、水溶性キチンなどが有効であるという報告がある（特開平3-130079号公報）。また、固定化リパーゼの再活性化法としては、一度加水分解を行い、回収した酵素剤をヘキサンなどの非極性溶剤で洗浄後、乾燥し、さらに水あるいは2価または3価の低級アルコールで浸潤処理を施すという方法も提案されている（特開昭61-149084号公報）。なお、この方法は、一度以上エステル交換に使用した固定化リパーゼについても有効である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】固定化リパーゼを使用するに際して、より高い活性をもった固定化リパーゼを調製する技術開発もさることながら、一度以上使用して活性が低下した固定化リパーゼを再活性化する技術開発

も、有用物質の実用上の製造コスト面から考えれば、極めて重要な技術開発の課題である。しかし、それに関する報告は未だに数少なく、前記の特開昭61-149084号公報においても、使用した固定化リパーゼの乾燥工程に長時間を要するだけでなく、浸潤する水分量には厳密な設定、例えばリパーゼ製剤1.87gに対して0.015gに調製する必要がある、複雑かつ精密な操作を必要とするなど、実用的にはかなり多くの問題点が残る。

【0006】すなわち、簡便でしかも短時間で固定化リパーゼを再活性化するような手法は、未だに提案されておらず、そのような技術の開発は、油脂工業における油脂の改質をはじめとして、各種の産業で有用に利用されているエステル類の改質および合成における効率的な実用手段として、大きく貢献する技術の一つとなると考えられる。

【0007】かかる実情に鑑み、本発明者らはエステル類の改質および合成において、一度以上使用して活性が低下した固定化リパーゼを簡便かつ短時間で再活性化する技術の開発を目的に鋭意検討し、本発明を完成するに至った。

【0008】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明はエステル類の改質または合成において、一度以上反応に使用した固定化リパーゼを非極性溶剤および極性溶剤で処理することを特徴とする固定化リパーゼの再活性化法である。

【0009】本発明で用いる固定化リパーゼは常法によって調製されるものでよく、動植物または微生物起源のリパーゼ、例えばブタ膵臓、ヒマ種子由来のリパーゼ、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス オリゼ (*Aspergil oryzae*)、リゾプス デレマー (*Rhizopus deleamar*)、リゾプス アーリザス (*Rhizopus arrhizus*)、ムコール ミーヘイ (*Mucor miehei*)、ムコールジャバニカス (*Mucor javanicus*)、キャンディダ シリンドラセ (*Candida cylindracea*)、ジオトリカム カンディダム (*Geotrichum candidum*)、ペニシリウム シクロピウム (*Penicillium cyclopium*)などの微生物由来のリパーゼを、活性炭、ケイソウ土、セライト、ゼオライト、シリカゲル、ガラス、獣骨、キチン、キトサン、ヒドロキシアパタイトなどの吸着材に吸着処理したり、セルロース、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂、両イオン交換樹脂、ポリエーテルやポリスルホン系高分子材に共有結合させたり、アルギン酸、ポリアクリル酸、増粘剤でもあるガム質に包括させたりして、固定化したものなどが使用できる。

【0010】次に本発明でいうエステル類とは、天然物と合成物とにかかわらず、カルボン酸とアルコール類とがエステル結合したものであり、1価から多価の、直鎖状あるいは側鎖状、ヒドロキシル基、不飽和結合や環状

構造の有無は問わず、これらのカルボン酸とアルコール類のエステルをいう。

【0011】天然物由来のものとしては、一般の動植物系油脂類、すなわち大豆油、なたね油、サフラワー油、ヒマワリ油、ゴマ油、綿実油、パーム油、パーム核油、ヤシ油、カポック油、ツバキ油、アーモンド油、カカオ脂、シア脂、バター脂、アマニ油、ヒマシ油、卵油、牛脂、ラード、魚油などのほか、これらの分別油脂、一部または全部の水素添加油脂、エステル交換油脂を含め、さらに藻類や微生物系の油脂類も利用できる。

【0012】また、合成系エステル類にあつては、カルボン酸として炭素数が1~25のアルキル基残鎖を有するものが望ましく、さらには炭素数5~21のアルキル基残鎖をもつ脂肪酸が好ましく、これらの例としては、カブロン酸、カプリル、酸2-エチルヘキサン酸、ノナン酸、カプリン酸、ラウリン酸、ドデカジカルボン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、パルミトオレイン酸、イソパルミチン酸、ステアリン酸、イソステアリン酸、オレイン酸、エライジン酸、リシノール酸、12-ヒドロキシステアリン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、エルシン酸、ベヘン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、酒石酸などが例示できる。他方、アルコール類としては、炭素数1~10のものが望ましく、これらの例としては、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、2-エチルヘキサノール、ミリスチルアルコール、ステアリルアルコール、オレイルアルコール、2-ヘキシルデカノール、イソステアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、エイコサノール、オクタコサノールなどの1価アルコール、エチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、ヘキシレングリコールなど、およびそれらの重合体やそれらの部分エーテルあるいは部分エステルなどの2価アルコールおよびその誘導体、グリセリン、トリメチロールプロパン、エリスリトール、ペンタエリスリトールなどの3価以上のポリオールおよびその重合体やそれらの誘導体、ブドウ糖、ショ糖、キシロースなどの糖類、アミノ系アルコール、ステロール類などがあげられる。本発明は、上記のようなカルボン酸およびアルコールのモノ~多価エステル類を対象とするが、例示に制限されるものではない。

【0013】本発明は、前述のような固定化リパーゼを用いて、かかるエステル類の改質すなわち加水分解あるいはエステル交換反応、または合成反応を行わしめるに際して、一度以上使用してリパーゼ活性が低下した固定化リパーゼの活性を効率よく高めることに特徴がある。本発明は、エステル類の処理のうち、とくにエステル交換反応に顕著な効果を示す。エステル交換反応とは、単一または複数種類のエステルの分子内および/または分

子間エステル基交換反応、エステルとカルボン酸を用いるアシドリシス反応、エステルとアルコールを用いるアルコールシス反応をいい、例えば油脂産業において油脂と油脂、油脂と脂肪酸および/または脂肪酸の低級アルコールエステル、油脂とグリセリンを用いる反応等は、本発明の好適とするところである。

【0014】本発明で用いる非極性溶剤としては、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、イソオクタン、石油ベンジンなどの炭化水素系溶剤、石油エーテル、ジメチルエーテル、ジエチルエーテル、メチルエチルエーテル、イソプロピルエーテルなどのエーテル系溶剤、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、ジエチレングリコールモノメチルエーテルのプロピルエステル、プロピレングリコールモノエチルエーテルの酢酸エステルなどのエステル系溶剤があげられるが、操作上、ヘキサン、石油ベンジン、石油エーテル、ジエチルエーテル、酢酸エチルなどが好ましい。また、極性溶剤としては、アセトン、メチルエチルケトン、ジエチルケトン、メチルイソブチルケトンなどのケトン系溶剤、イソプロピルアルコール、ブチルアルコール、シクロヘキサノールなどのアルコール系溶剤が使用でき、とくにアセトンが好ましい。

【0015】かかる非極性溶剤と極性溶剤とを組み合わせる固定化リパーゼを処理するが、なかでもn-ヘキサンとアセトンの組み合わせが効果的である。非極性溶剤および極性溶剤は、固定化リパーゼに対して1~50重量倍、通常3~30重量倍を使用するのがよい。1重量倍以下の溶剂量では、固定化リパーゼのリパーゼ活性を阻害する要因を排除できず、50重量倍以上では、リパーゼの蛋白質そのものを変性させ、かえって失活を促進させる。非極性溶剤および極性溶剤の組み合わせは、各々を単独で、いずれの順序で固定化リパーゼを処理してもよく、また混合して使用してもよく、それらの比率はとくに限定されない。

【0016】本発明では、かかる溶剤を用いて、一度以上反応に使用した固定化リパーゼを処理するが、この処理方法としては次のようにすればよい。すなわち、沈澱、濾過、遠心分離などで反応系中から固定化リパーゼを回収し、必要に応じて吸着操作などで付着している原料、反応中間体、生成物などを予め粗く除去し、上記の溶剤中に浸漬あるいは単に洗浄し、残存する溶剤を風乾、減圧、凍結乾燥などの常法により留去する。このような簡単な操作で、固定化リパーゼのリパーゼ活性は再活性化されるので、これは再び通常通りのエステル類の改質または合成反応に供することができる。

【0017】

【実施例】

参考例

固定化リパーゼとして、陰イオン交換樹脂にグリセリドの1, 3位に特異性の高いムコール ミーヘイ (Mucor miehei) 由来のリパーゼを固定化したL IPOZYME

(ノボ社製) 300 gを1リットル容カラムに充填し、60℃でパーム油およびなたね油(4:6)を360 g/hrの流速で通液してエステル交換反応を行った。この時の油の水分量は300ppm、L I P O Z Y M E中の水分量は15% (重量比)であった。15日目でエステル交換反応率が51%まで低下した時点でL I P O Z Y M Eを回収した。

【0018】なお、この固定化リパーゼのエステル交換活性およびエステル交換反応率は、次のようにして求めた。エステル交換活性：トリオレインとパルミチン酸をn-ヘキサン中、固定化リパーゼとともに攪拌し、生成物のトリグリセリドに取り込まれたパルミチン酸の量をGLC (ガスクロマトグラフィー) 分析値から求め、トリグリセリドに1μモルのパルミチン酸を取り込み得る

溶剤洗浄による固定化リパーゼの再活性化効果

	未使用	n-ヘキサン で洗浄 (比較例1)	アセトン で洗浄 (比較例2)	n-ヘキサンおよび アセトンで洗浄 (実施例1)
相対活性 (%)	100	30	45	70

(注) 各処理物の活性は、参考例で得られた回収L I P O Z Y M Eを

各溶剤で洗浄した後のエステル交換活性を示す。

【0021】比較例1

実施例1の比較例として、参考例で得たL I P O Z Y M Eを5倍量のn-ヘキサンのみで洗浄し、そのエステル交換活性を測定した結果、初期活性の30%であった。

【0022】比較例2

実施例1の比較例として、参考例で得たL I P O Z Y M Eを5倍量のアセトンのみで洗浄し、そのエステル交換活性を測定した結果、初期の45%であった。

【0023】実施例2

参考例で得たL I P O Z Y M Eに対して、それぞれ5倍量のn-ヘキサンおよびアセトンを用いn-ヘキサン、次いでアセトンの順で洗浄し、再度カラムに充填してエステル交換反応を行った。この操作を3回繰り返し行い、その時のエステル交換反応率の経時変化を図1に示した。同図より、本発明の再活性化処理によりエステル交換活性の低下したL I P O Z Y M Eが繰り返し使用できることがわかった。

【0024】実施例3

参考例で得たL I P O Z Y M Eを、3倍量の石油ベンジン、次いで5倍量のメチルイソブチルケトンにそれぞれ浸漬処理して洗浄し、溶剤を減圧留去して、油脂に対して5重量%の溶剤処理したL I P O Z Y M Eを用い、攪拌装置付バッチ式反応容器中で実施例1と同様のエステル交換反応を行ったところ、4日目のエステル交換反応率は87%まで再活性化された。

酵素活性を相対評価した。エステル交換反応率：グリセリドの1, 3位が完全にエステル交換された場合の成分に対する実際の反応成分の割合から求めた。

【0019】実施例1

参考例で得たL I P O Z Y M Eを、L I P O Z Y M Eの重量に対してそれぞれ5倍量 (重量比、以下同じ) のn-ヘキサンおよびアセトンの混合溶媒で洗浄し、再度カラムに充填し、参考例と同様にエステル交換反応を行った結果、エステル交換反応率は92%まで回復した。また、この時のエステル交換活性は、表1に示すように初期活性の70%にまで回復していた。

【0020】

【表1】

【0025】実施例4

リゾプス デレマー (Rhizopus delemar) 由来のリパーゼ (生化学工業 (株) 製) 0.5 gをイオン交換水30 mlに溶解・分散させ、アニオン交換樹脂30 gとかきまぜてスラリー状にし、これを乾燥して固定化リパーゼを調製した。該固定化リパーゼ10 gを、イソ酪酸1モルおよびn-オクタノール5モルの比率で原料100 gを仕込んだ攪拌装置付ガラス製反応容器に添加し、40℃でゆるやかに攪拌してエステル合成反応を行った。反応物中の、目的であるn-オクチルイソ酪酸エステルの生成率を、薄層クロマトグラフィー (TLC) およびガスクロマトグラフィー (GLC) で分析したところ、300時間の反応で85%であった。反応物から固定化リパーゼを濾別し、固定化リパーゼに対して20倍量のn-ヘキサン、次いで5倍量のアセトンで洗浄し残存溶剤を留去した後、新たな同じ原料を用いて、上記と同様の条件で再び合成反応を行ったところ、300時間後のn-オクチルイソ酪酸エステルの合成率は82%であった。

【0026】比較例3

実施例4の比較例として、実施例4のエステル合成反応を1回行い、反応物から濾別した固定化リパーゼをそのまま用いて、実施例4と同様に2回目の合成反応を行ったところ、300時間後の目的のエステルの合成率は68%であった。

【0027】実施例5

参考例のL I P O Z Y M E のかわりに実施例4で調製した固定化リパーゼを用いて、参考例と同条件でエステル交換反応を行った。10日目でエステル交換活性は初期の活性の43%に低下し、この時点で固定化リパーゼを反応物から濾別し回収した。次いで、実施例1と同様に固定化リパーゼを溶剤で洗浄し、再びエステル交換反応に供したところ、エステル交換活性は初期の75%まで回復した。

【0028】実施例6

キャンディダ シリンドラセ (*Candida cylindracea*) 由来のリパーゼ (名糖産業 (株) 製) を用いて、実施例4の方法および操作で、固定化リパーゼを調製し、実施例4のオレイン酸1モルおよびn-デカノール5モルのかわりに、オレイン酸1モルおよびグリセリン1モルを用いて、40℃でグリセリドの合成反応を行ったところ、5日後の生成グリセリド中へのオレイン酸のエステル化率は85%であった。反応物から回収した固定化リパーゼを、各5倍量の石油エーテル、次いでn-ブチル

アルコールで洗浄し、残存溶剤を減圧留去後、上記と同条件で新たな原料の合成反応を行った。この操作を10回繰り返したところ、グリセリド中へのオレイン酸のエステル化率は、2回目：83%，5回目：80%，10回目：75%であった。一方、上記と同様の操作で、固定化リパーゼを溶剤処理しない場合のグリセリド収率は、2回目：70%，5回目：65%，10回目：41%であった。

【0029】

【発明の効果】本発明の手法を用いれば、エステル類の改質または合成に用いる固定化リパーゼの活性を再活性化でき、より長時間にわたって反復使用することができる。さらに、本手法は、大変簡便であり、工業的規模での実施が容易である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2における固定化リパーゼの再活性処理効果を示す図であり、横軸は反応時間 (日)、縦軸はエステル交換率 (%) である。

【図1】

